呕吐毒素酶联免疫定量检测试剂盒说明书

ELISA kit for quantitative detection of Deoxynivalenol

一、概要

呕吐毒素(Vomitoxin)，是一种单端孢霉烯族毒素，主要由禾谷镰刀菌和粉红镰刀菌产生，化学名称为脱氧腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol，DON)，容易存在于各种谷物类粮食及加工产品中，污染水平一般为 mg/kg（ppm）级。DON 具有很强的细胞毒性。人误食 DON 含量高的食物后，容易导致急性中毒头昏、腹胀、恶心、呕吐，以及白细胞缺乏症。

目前通常应用酶联免疫吸附测定法（ELISA）对谷物（小米、玉米、大麦等）及其制品（蛋糕、饼干、面包等）中的 DON 含量进行快速、定量检测。

二、原理

本试剂盒是利用间接酶联免疫吸附微孔模式进行检测，灵敏度可达 12.5 μg/kg（ppb）。样品或标准品中游离的呕吐毒素与包被在微孔中的抗原竞争结合游离单克隆抗体上的结合位点，形成抗原抗体结合物，经洗板洗去多余的抗体与呕吐毒素后，加入酶标记的二抗与单克隆抗体结合，经再次洗板后加入显色剂与反应底物，其与酶标物作用而成蓝色，加入反应停止液后颜色由蓝色转变为黄色，黄色越深则表明呕吐毒素越少，用酶标仪在 450 nm 处测定光吸收值可准确定量检测样品中的呕吐毒素污染水平。

三、试剂盒构成

1、 反应板支架…………………………………………………………1 块
2、 呕吐毒素抗原包被反应板………………………………………………….96 孔
3、 呕吐毒素标准品溶液 （0 ppb，12.5 ppb，25 ppb，50 ppb，100 ppb，200 ppb）…1 套
4、 呕吐毒素单克隆抗体…………………………………………………1 瓶
5、 稀释液…………………………………………………………………1 瓶
6、 酶标二抗溶液…………………………………………………………1 瓶
7、 显色剂溶液 ……………………………………………………………1 瓶
8、 反应底物溶液 …………………………………………………………1 瓶
9、 终止液 ………………………………………………………………1 瓶
10、浓缩洗涤液（20 X）………………………………………………… 1 瓶

四、注意事项

1、试剂盒请置放于 2-8℃条件下保存，使用过程中不要让微孔干燥，使用后立即将试剂放回至 2-8℃条件下冷藏。

2、标准品和无色的反应底物对光敏感，避免直接暴露在光线下。

3、吸取不同的液体后，要更换枪头，即使是吸取标准品时。

4、尽量避免所有试剂接触皮肤。

5、试剂盒应在有效期内使用。不同批号的试剂盒不能混用。试剂稀释或掺杂使用会使灵敏度降低。

6、对玻璃器皿和 DON 溶液消毒最好用次氯酸钠（10%；v/v）溶液（将溶液用 HCl 调整至 PH 7）浸泡过夜。

五、样品处理

1、饲料、谷物、麦芽

准确称取 5.0 g 样品进行粉碎以使 75%的样品可以通过 20 目筛，样品的大小颗粒与速溶咖啡相当。接着将粉碎后的样品放入三角瓶中，加入 25 ml 甲醇与水（1：9）的混合液，振荡 15 min。然后用定量滤纸过滤，收集滤液。取适量滤液进行检测分析。

2、啤酒和麦芽汁

上海佑隆生物科技有限公司 www.youlong-bio.com.cn
地址：上海市顺义路 18 号绿地同创大厦 1802/1804 室
联系电话：021-60955248；传真：021-60955249； E-mail: info@youlong-bio.com.cn

取一定量的啤酒样品，搅拌，除去过量的CO_2（直到不再产生明显的气泡）。静置片刻后即可进行检测分析。麦芽汁样品直接进行检测分析。

(注：如果样品在处理过程中产生混浊，建议先进行无菌过滤再检测)

六、实验步骤

(一)实验准备

1、使用前请先将试剂盒拿出冰箱，放到室温环境下回温 10 min。

2、本试剂盒所提供的 DON 抗体是浓缩液，使用前请先用稀释液进行稀释。用 2.0 mL 稀释液将 1 瓶 DON 抗体溶解，配制的溶液够 36 孔使用。

3、本试剂盒所提供的酶标二抗是浓缩液，使用前请先用稀释液进行稀释。用 4.0 mL 稀释液将 1 瓶酶标二抗浓缩液溶解，配制的溶液够 36 孔使用。

4、本试剂盒所提供的浓缩洗涤液用蒸馏水稀释 20 倍后即可使用。例如：4 mL 浓缩洗涤液+76 mL 蒸馏水，足够 36 孔使用。

(二)测定程序

1、根据样品检测数插入足够数量的酶标板微孔于反应板支架上。标记好标准品孔和样品孔。然后每孔加入 250 μL 左右稀释好的洗涤液，放置 1 min，倒掉液体后将酶标板在报纸或毛纸上用力拍干。

2、在各个标准品孔中加入 50 μL DON 标准品(0 ppb、12.5 ppb、25 ppb、50 ppb、100 ppb、200 ppb)，在样品孔中加入 50 μL 样品液。

3、每孔都加入 50 μL 稀释后的 DON 抗体溶液。轻轻摇匀混合，然后在 37℃恒温孵育 60 min。

4、孵育结束后甩掉微孔中的液体，然后每孔加入 250 μL 左右稀释好的洗涤液，放置 1 min，倒掉液体。重复洗涤 3 次。倒掉液体后将酶标板在报纸或毛纸上用力拍干。

5、每孔都加入 100 μL 稀释后的酶标二抗溶液。然后再 37℃恒温孵育 30min。

6、孵育结束后甩掉微孔中的液体，然后每孔加入 250 μL 左右稀释好的洗涤液，放置 1 min，倒掉液体。重复洗涤 3 次。倒掉液体后将酶标板在报纸或毛纸上用力拍干。

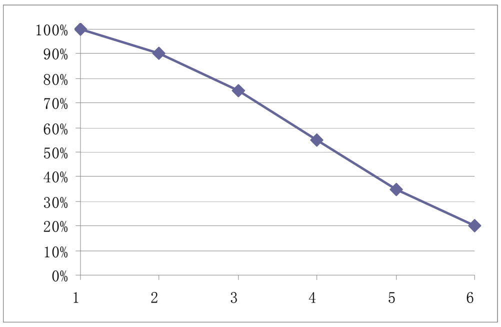
7、每孔分别加入 50 μL 显色剂和 50 μL 反应底物，轻轻摇匀混合后，恒温孵育箱中 37℃显色 15 min。

8、显色反应结束后每孔加入 50 μL 终止液。用酶标仪在 450 nm 处进行测定。必须在加入终止液后 10 min 内完成。

七、结果判定

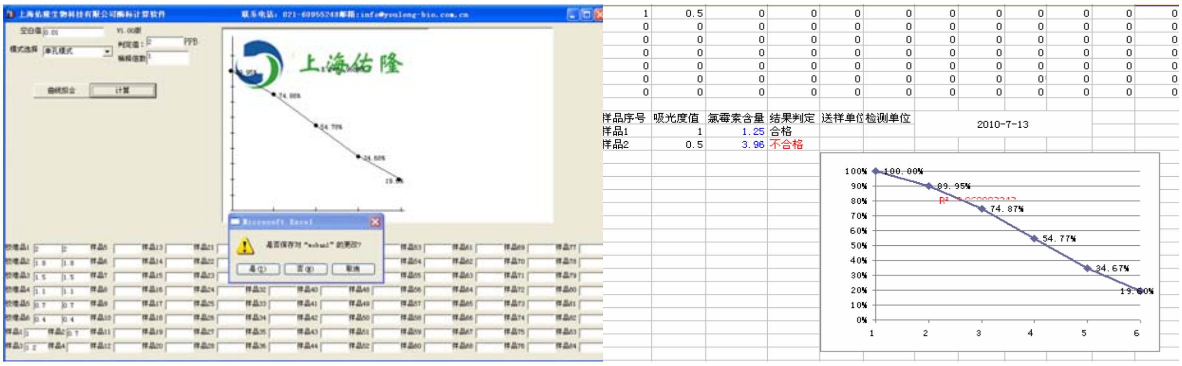
用酶标仪在 450 nm 处测得每孔的光吸收值(A)绘制标准曲线。通过标准曲线，可准确定量样品中 DON 含量。

标准曲线：横坐标为 DON 标准品浓度，纵坐标为百分比（即各标准品孔和样品孔光吸收值除以 0 ppb 标准品孔光吸收值再乘以 100%所得）。相应每个样品的 DON 浓度可从曲线上获得。



标准曲线（仅作参考）

八、酶标计算专业软件

酶联免疫测定法（ELISA）是目前食品安全检测、医疗检测以及环境监测等中最广泛的免疫分析方法，可用于目标物质的定量测定。一般而言，在未知样品测定前，需测定梯度标准物质建立标准曲线方程。然后根据未知样品的 OD 值或者其变化值，代入标准曲线方程，获得未知样品中待测物质的浓度。然而，常规方法均使用手动计算或者绘制图，来获得一个个的最终数据，该方法费时、繁琐以及人为错误概率高。

据此，本公司开发出酶标计算专业软件（YL software 1.0 版），专门解决该酶标测定中的计算难题，并可根据实际需要，自动调整计算数目，最多可同时计算一整块酶标板（96 孔）的数据，并可同时导出通用 excel 文档，编辑和保存。根据实际中的应用,该软件分为两种计算模式:单孔模式与双孔模式。双孔模式即取该点的两个值进行取平均值再进行计算,最终根据数据来判定是否合格,未合格以及未检测。